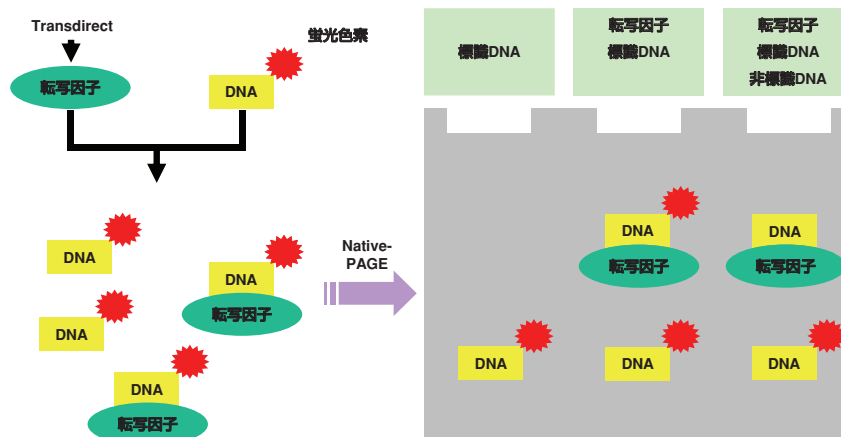
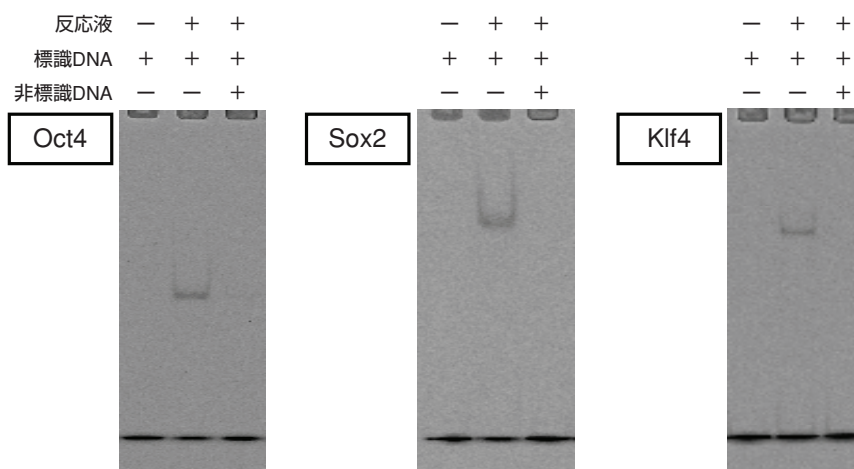
[タンパク質-DNA間相互作用解析]

無細胞タンパク質合成系の用途として、ゲルシフトアッセイ（EMSA：Electrophoresis Mobility Shift Assay）による転写因子の結合配列解析（タンパク質-DNA間相互作用解析）が広く行われてきました。今回は、Transdirectを用いてiPS細胞作製因子としても注目されるOct4、Sox2、Klf4を合成し、その活性（DNA結合能）をEMSAにより確認しましたのでご紹介します。

実験手順

Oct4、Sox2、Klf4のコード領域をpTD1へクローニングした。これより調製したmRNAを用いて翻訳反応を行った。タンパク質合成反応後、それぞれ特異的結合配列を有する2本鎖DNAプローブ（5'末端をCy5により蛍光標識）と混合し、DNA結合反応を行った。その後、Native-PAGE法にて分離し、蛍光イメージアナライザーを用いて検出した。

結　果

3種類の転写因子それぞれにおいて、結合配列特異的なバンドのシフトが確認されました。またこれらは、蛍光標識により簡便に検出することが出来ました。

以上より、Transdirectの合成反応液に標識DNAプローブを添加することで、反応液のまま、目的タンパク質のDNA結合活性を簡便に確認することが可能であることが示されました。

無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect *insect cell*

方 法

• 発現ベクターへのクローニング及びmRNAの調製

3種類の転写因子Octamer-binding transcription factor 4（Oct4）、SRY （sex determining region Y）-box 2（Sox2）、Krüppel-like factor 4（Klf4）のコード領域をpTD1にクローニングした。その後、キット付属の取扱説明書に従ってmRNAの調製を行った。

• タンパク質合成

タンパク質合成は、Transdirect付属の取扱説明書と同様の方法（50 μLスケール）で行った。反応終了後、15,000 rpm、15分間、20 ℃で遠心分離し、その上清9 μLをDNA結合反応に用いた。

• DNA結合反応

DNA結合反応に用いた2本鎖DNAプローブは、5'末端をCy5で標識した相補鎖オリゴを合成し、アニールして調製した。配列を表1に示す。

結合反応は30 μLスケールで行った。まず、表2の組成（標識DNAプローブ以外）にて25 ℃で10分間保温し、その後標識DNAプローブを添加し、さらに25 ℃で20分間保温して行った。

表1．DNAプローブの配列

Oct4用DNAプローブ	TGTCGAATGCAAATCACTAGAA
Sox2用DNAプローブ	CCAAGGCCATTGTAATGCG
Klf4用DNAプローブ	ATGCAGGAGAAAGAAGGGCGTAGTATCTACTAG

※赤字は報告のあった認識配列を示す

表2．DNA結合反応組成

30 % (v/v)	合成反応液（9 μL）
10 mM	Tris-HCl pH8.0
50 mM	NaCl
1 mM	DTT
0.05 %	TritonX100
25 ng/μL	Salmon sperum DNA
10 %	Glycerol
250 nM	非標識DNAプローブ
1.25 nM	Cy5標識DNAプローブ
合計	30 μL

• タンパク質-DNA間相互作用の検出

結合反応終了後、各反応液12 μLを5-20 %グラジエントゲルを用いたNative-PAGE法（0.5×TBE、250 V、30 min）にて分離した後、蛍光イメージアナライザーを用いて検出した。

技術に関するお問合せは・・・

分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット

TEL　(075) 823-1351
WEB　https://solutions.shimadzu.co.jp/form/biotech/contact.html
E-Mail　t-direct@shimadzu-biotech.jp

Transdirect *insect cell* (P/N S292-30000-91)

■キット内容
・Insect Cell Extract (黄) ×5本
・4mM Methionine (赤) ×1本
・0.5μg/μL pTD1 Vector (緑) ×1本
・Reaction Buffer (青) ×1本
・0.5μg/μL Control DNA (白) ×1本
・取扱説明書

■反応回数：40 回 (50μL合成反応系)
■保存温度：−80℃
■価　格：31,185円 (税込)

〈ご注意〉・試薬キットロット間の合成量には、多少の差が見られますがご了承ください。
・概観及び仕様は予告なく変更することがありますのでご了承ください。
・本製品の使用は試験研究用のみです。臨床、医薬品・食品製造用途には使用できません。

バルクキット(受注生産のため、詳細はお問い合せください。)

		■価格 (税込)
20キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット20 **(P/N S292-30000-92)**	404,250円
50キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット50 **(P/N S292-30000-93)**	924,000円
100キット相当分	Transdirect *insect cell* バルクキット100 **(P/N S292-30000-94)**	1,617,000円

バルクキットには、pTD1 VectorとControl DNAは含まれません。

JQA-0376

※価格は2011年1月1日現在のものです。
※仕様および価格は改良のため、予告なく変更することがありますので，ご了承ください。

島津製作所　分析計測事業部　604-8511　京都市中京区西ノ京桑原町1

バイオ・臨床ビジネスユニット
604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1 (075) 823-1351
http://www.an.shimadzu.co.jp

取次店

3219-02102-30A-IK